Actividad de lisozima en hemolinfa de larvas y pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Medina Pereyra, Pilar[1]; Felipe Castro[1]; Francisco M. Fernández[2]

[1] Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina, licpilarmedina@hotmail.com

[2] Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán, Miguel Lillo 205, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.

➤ **Resumen** — La lisozima es una enzima bacteriolítica ampliamente distribuida en los seres vivos. La determinación de su actividad por el método turbidimétrico, que consiste en la medición de la lisis de *Microccocus luteus* por la enzima, ha presentado resultados disímiles en estudios comparativos previos. Se midió la actividad de la lisozima (AL) por dicho método en la hemolinfa (HL) de larvas y pupas de la especie plaga *Spodoptera frugiperda* para cuantificarla y para determinar la relación existente entre concentración y actividad. Se utilizaron diluciones de las muestras de HL (12,5; 25 y 50 %). Los resultados mostraron que, tanto en larvas como pupas, las muestras menos diluidas produjeron actividades líticas mayores, pero menores a lo esperable a partir de la concentración ensayada. Asimismo las actividades líticas específicas (AL/uL HL) o sea en función de la cantidad absoluta de lisozima presente fueron mayores en las muestras más diluidas. Las lecturas tomadas a tiempos fijos tampoco guardaron relación directa con la concentración, siendo las lecturas en la HL de larvas y de pupas similares. Se destaca que la actividad de la HL tiene mayor duración en los ensayos con respecto a lo observado en leche de mamíferos.

Palabras clave: Hemolinfa, lisozima, *Spodoptera.*

➤ **Abstract** — «Lysozyme activity in hemolymph of larvae and pupae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)». Lysozyme is a bacteriolytic enzyme widely distributed among living organisms. The determination of its activity using turbidimetric methods, consisting in measuring of lysis of *Microccocus luteus* by the enzyme, has given dissimilar results in previous comparative studies. The lysozyme activity (AL) was measured using this method in the hemolymph (HL) of larvae and pupae of the plague species *Spodoptera frugiperda*, in order to quantify it and in order to dertermine the existing relation between concentration and activity. Dilutions of HL samples (12.5; 25 and 50 %) were used. Results showed that in both larvae and pupae, the least diluted samples produced greater lytic activity, although it was lower than expected starting at the tested concentration. Moreover specific lytic activities (AL/uL HL) as a function of the absolute quantity of lysozyme present were greater in the more diluted samples. Readings taken at specified intervals did not have a direct relation on the concentration either, these readings in HL of larvae and pupae being similar. It is noted that the activity of HL has greater duration in assays when compared to what has been observed in mammalian milk.

Keywords: Hemolymph, lysozyme, *Spodoptera*.

INTRODUCCIÓN

La lisozima es una enzima bacteriolítica que se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos. Se la ha estudiado en virus, bacterias, plantas, protozoos, invertebrados y vertebrados. Su actividad principal consiste en romper los enlaces de las uniones β (1-4) del ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina que forman parte de los *peptidoglicanos* en las paredes de bacterias Gram (+) (Benarjee *et al*., 1973), lo cual conduce a la lisis de la bacteria. La muerte bacteriana puede también ocurrir sin lisis (Düring *et al*., 1999; Ibrahim *et al*., 2001; Markart *et al*., 2004), por una desestabilización de la membrana producida por esta proteína, lo cual ha sido observado también en insectos (Gandhe *et al*., 2007). La actividad lítica se determina, clásicamente, midiendo la dismi-

Recibido: 28/02/12 – Aceptado: 10/06/12

nución de la absorbancia producida sobre suspensión de bacterias susceptibles (*Micrococcus luteus*). La medida de la disminución de la densidad óptica indica la actividad de la lisozima. Debido a que esta enzima forma parte de los mecanismos de defensa (Vilmos y Kurucz, 1998), sus características han sido muy estudiadas en la hemolinfa de insectos, tanto en adultos y larvas así como en huevos (Fernandez-Sousa *et al.*, 1977; Sun *et al.*, 1991; Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994; Kopáček *et al.*, 1999; Masaki *et al.*, 2001; Matsuura *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Nasr y Fallon, 2003; Kajla *et al.*, 2010). Asimismo, algunos estudios analizaron su relación con otros sistemas de defensa como es el caso de la relación de compensación existente con el sistema de la profenoloxidasa y su participación en la activación de la vía Toll (Rao *et al.*, 2010) y con el sistema digestivo a través de una actividad de quitinasa (Regel *et al.*, 1998; Erban y Hubert, 2008).

Spodoptera frugiperda (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), insecto americano de amplia distribución Neotropical, constituye una plaga de gran importancia agrícola, por los daños que produce en maíz, sorgo, soja, algodón, y otros cultivos (Willink *et al.*, 1990; Murúa *et al.*, 2009). Se han estudiado algunos aspectos como la secuenciación de la lisozima y proteínas similares a la lisozima en esta especie (Svensson *et al.*, 2005; Chapelle *et al.*, 2009) y en *S. exigua* (Bae y Kim, 2003; Shresta y Kim, 2009). De la lectura de los trabajos sobre medición de lisozima (Chapelle *et al.*, 2009; Adamo, 2004; Kajla *et al.*, 2010), se observa una gran variabilidad en los métodos, como así también de los resultados obtenidos, aún con el empleo de protocolos similares, lo cual no tiene una explicación e impide su utilización comparativa. Es el caso del uso de placas de inhibición de crecimiento y método turbidimétrico con medición a tiempo final.

Por trabajos anteriores realizados en leche de mamíferos hemos puesto en evidencia la necesidad de revisar los antecedentes y protocolos de la metodología de medición de la actividad de la enzima mediante turbidimetría (Castro *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009) debido al hecho que las mediciones a tiempo final fijo no reflejan la concentración de la enzima y no son proporcionales a la velocidad inicial de la misma. Esta falta de correspondencia hace dudosa la utilidad del método para fines comparativos, hecho que afectaría, cuando se lo lleva a cabo en insectos plaga, a los ensayos sobre control que tomen en cuenta el impacto del tratamiento sobre la actividad de la enzima y viabilidad del insecto.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la actividad de la lisozima, no inducida por estimulación previa, en hemolinfa de larvas y pupas de *Spodoptera frugiperda*, a distintas concentraciones y en distintos intervalos de tiempo para determinar la relación entre concentración de la enzima y actividad lítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos - Las larvas de *Spodoptera frugiperda* fueron criadas en laboratorio a una temperatura controlada de 26 ± 1 °C, con 60 ± 10 % de humedad relativa y alimentadas con una dieta artificial basada en la descripta por Valverde *et al.* (1995), con modificaciones menores consistentes en la exclusión de caseínas y antibióticos, y la inclusión de acido sórbico (0,1 %) y un complejo vitamínico. Estas pequeñas modificaciones demostraron mejorar la supervivencia de los insectos en nuestras condiciones de cría (Medina Pereyra, P., en preparación).

Obtención de la hemolinfa - Las extracciones de hemolinfa (HL) de larvas se hicieron a partir de individuos del último estadio larval, formando un pool de 5 larvas. Las mismas fueron previamente refrigeradas en freezer a -5 °C por 40 minutos, para lograr su sedación. La hemolinfa se obtuvo mediante un corte de una de las pseudopatas abdominales de cada larva. En el caso de las pupas (3 individuos de 2° día), se extrajo por punción en la zona ventral del abdomen entre el 4° y 5° segmento. Las muestras fueron colectadas por medio de una jeringa

Hamilton de 25 μl, en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Como inhibidor de la profenoloxidasa cuyo producto final, la melanina, interferiría colorimétricamente en la determinación, se utilizó feniltiourea a una concentración final de 20 μM (Feng *et al.*, 2008). Pruebas previas realizadas en nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento de la hemolinfa con feniltiourea, para evitar la activación de la profenoloxidasa, no afecta la actividad de la lisozima (Medina Pereyra, P., en preparación). Todas estas maniobras se llevaron a cabo manteniendo los tubos sobre una mezcla refrigerante a 9 °C bajo cero. Los instrumentos utilizados (tijera quirúrgica, jeringa, etc.) así como la superficie larval y pupal fueron limpiados con alcohol 70 % antes de realizar la incisión. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C para excluir las células de la hemolinfa. El sobrenadante obtenido que se utilizó fue diluido con buffer HEPES 50 mM, pH 7,2. Para efectuar las determinaciones se utilizaron tres diluciones con porcentajes de hemolinfa: al 50, 25 y 12,5 %.

Medición de la actividad lítica de la hemolinfa - La actividad lítica de la lisozima de la hemolinfa de *S. frugiperda* fue medida mediante el método turbidimétrico (John, 1993) con las siguientes modificaciones. Se utilizó una suspensión de *Microccocus luteus* (Sigma) en buffer HEPES (ácido 4-(2- hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico) 50 mM, pH 7,2. Los micrococos liofilizados fueron previamente lavados con buffer HEPES y suspendidos de forma tal que tuvieran una D.O. de 0,600 leída a una longitud de onda de 540 nanómetros. A 2 ml de dicha suspensión, se le agregó 25 μl de la dilución de hemolinfa. Se hicieron lecturas a diferentes intervalos de tiempo: cada 15 segundos hasta el tercer minuto; luego cada 60 segundos hasta los cinco minutos; a continuación cada 5 minutos hasta los 30 minutos, y cada 10 minutos hasta completar una hora, ó más según el ensayo. Se tomaron tres tubos y se realizaron lecturas a 3 y 5 horas, y otro tubo fue dejado hasta 115 horas. Todas las lecturas se llevaron a cabo a una temperatura ambiente de 21°C. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Para realizar las curvas de actividad lítica se tomaron los valores de densidad óptica y a cada valor obtenido se le restó el valor correspondiente al tiempo cero. De esta manera se obtuvo la diferencia (Δ) de densidad óptica respecto al tiempo cero inicial, la cual resulta un valor positivo y creciente con el tiempo que representa fielmente la actividad lítica. Debido al hecho que la actividad lítica tomada durante más de tres minutos se tornaba claramente curvilínea, se calcularon las velocidades iniciales mediante ecuaciones lineales de las mediciones realizadas en el primer minuto y medio, en el que se mantenían aceptablemente lineales (ecuación de la recta: $R^2 = 0,998 \pm 0,001$). Para el análisis de los datos, se utilizaron los programas: GraphPad Statmate 1.01, GraphPad Instat, y Calc integrante del Open Office para Windows.

RESULTADOS

Como era esperable, las muestras más diluidas proporcionaron actividades líticas menores. Sin embargo los efectos líticos no fueron proporcionales a las concentraciones de la enzima (Fig. 1), y las lecturas a tiempo fijo no guardarían una relación directa con su concentración. Por ejemplo, a los 10 minutos las lisis producidas por las muestras con porcentajes de hemolinfa de 12,5; 25 y 50 % produjeron cambios (medidos en mU de Absorbancia) de 74:102:126, cuando debieran ser de 74:148:296 si se toman en cuenta las diluciones y se utiliza como referencia a la más diluida.

Los valores de las velocidades iniciales que fueron medidas cada 15 segundos hasta 1,5 minutos utilizando ecuaciones lineales se indican en la Tabla 1. En ella se muestran los resultados correspondientes a hemolinfa de larvas y de pupas. Como se observa (tercera y quinta columnas), con valores de concentración mayores, la velocidad es mayor, pero no linealmente proporcional. Ello trae como consecuencia que, al considerarse la velocidad de cada ensayo en función de la

cantidad (masa) de lisozima, se observa que las mayores velocidades líticas por cantidad de lisozima se obtienen con las muestras más diluidas (cuarta y sexta columnas). A este parámetro de la actividad de lisis podemos denominarlo, provisoriamente y para el caso, velocidad inicial específica. En la Tabla 1, se puede apreciar, además, que las diferencias entre las actividades líticas de larvas y de pupas no exceden un orden de magnitud.

Otro aspecto destacable de la actividad lítica de este insecto es su persistencia en el tiempo. Ello quedó demostrado al dejar los tubos de reacción, durante un tiempo prolongado (3; 5 y 115 horas), con la muestra de hemolinfa (con un porcentaje de 50 %) y la suspensión de los micrococos a la temperatura de ensayo. Así, al cabo de 5 horas se observó que en los tubos persistía una actividad lítica residual. Esta actividad correspondía a un 1,6 % de la velocidad inicial (en el primer minuto) y a un 10 % de la velocidad media para la primera hora. La muestra que fue dejada durante 115 horas a temperatura ambiente mostró, al cabo de este lapso, que retenía una velocidad de lisis cercana a una milésima parte (0,12 %) de la velocidad inicial.

DISCUSIÓN

Este trabajo determinó la actividad lítica de la lisozima extraída de la hemolinfa de *S. frugiperda* de larvas y pupas. Se utilizó el método de turbidimetría y se evaluaron distintas diluciones a fin de establecer la relación entre la concentración de la enzima y la actividad lítica. El análisis de los resultados debe considerar dos enfoques: en primer lugar, lo que corresponde a la actividad lítica de hemolinfa de la especie (ello incluye, con las precauciones del tema, los aspectos atribuibles a los insectos en general); y en segundo término, lo relacionado con las características especiales de la lisozima que se evidencian a partir de la utilización del método turbidimétrico. En este sentido caben un par de aclaraciones. El uso de este método, constituye la forma más cercana a la actividad lítica real que la enzima lleva a cabo en los organismos vivos: la destrucción bac-

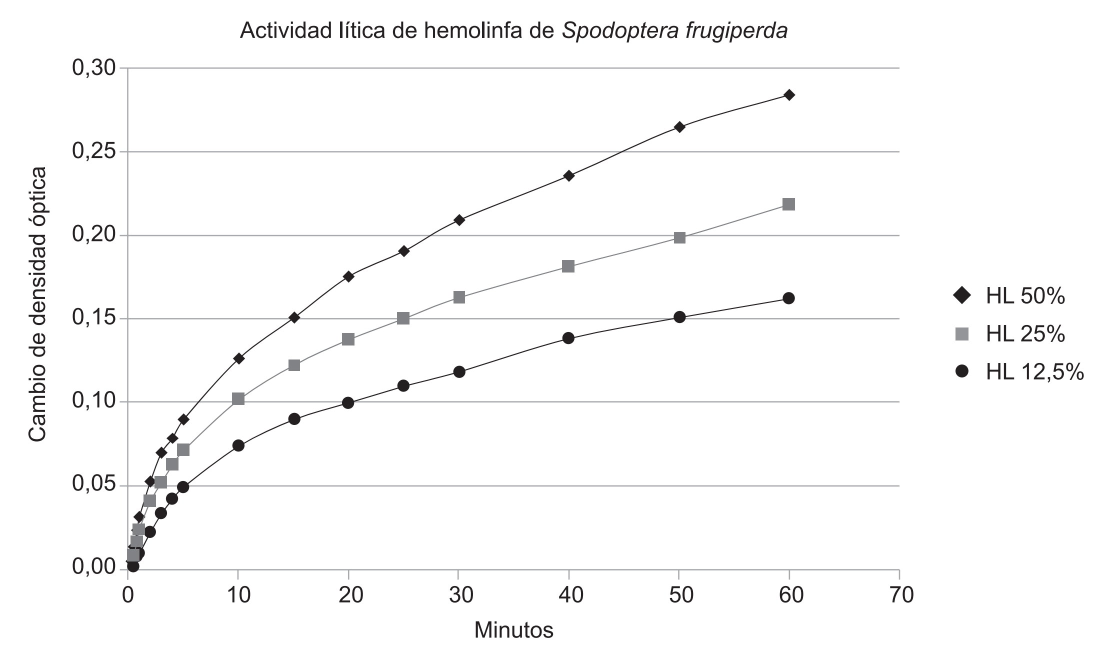


Figura 1. Curvas de actividad lítica de lisozima de hemolinfa de *Spodoptera frugiperda* en diferentes diluciones de hemolinfa.

Tabla 1. Velocidades iniciales calculadas para cada concentración de hemolinfa. AI, Actividad inicial; AIL, actividad inicial en larvas; AIP, actividad inicial en pupas; HL, hemolinfa.

Dilución % de HL	µl de HL	Larvas - AI mU Abs/min	AIL / µl de HL	Pupas - AI mU Abs/min	AIP / µl de HL
12,5	3,125	25,7	8,224	13	4,16
25	6,25	33,1	5,296	22,8	3,648
50	12,5	38,1	3,048	41,8	3,344

teriana. Por otra parte, se evitó el uso de la terminología específica derivada de la teoría de Michaelis-Menten por las razones que se exponen más abajo, aun cuando algunas de las variables mencionadas son fácilmente reconocibles como homólogas.

La actividad lítica espontánea en la hemolinfa de *S. frugiperda*, medida como velocidad inicial (Vi) de la dilución con mayor actividad, mostró un valor aproximadamente entre 50 y 100 veces superior a lo conocido para leche de cabras, siendo aproximadamente similares los datos existentes sobre leche materna, tapir y loba marina (Castro *et al.*, 2009).

Lo más destacable que se debe mencionar sobre los presentes resultados tiene que ver con el comportamiento de las distintas diluciones de la hemolinfa, y en consecuencia de la enzima. Tal como se señaló, con diluciones mayores, o sea con concentraciones menores de la enzima, se encuentra que la actividad inicial «específica» de la enzima tiende a aumentar cuando se diluye la muestra, por lo menos hasta un porcentaje de 12,5 %. En la base del problema, se encuentra el hecho que la partícula-sustrato impone una mecánica de funcionamiento enzimático que no es congruente con los postulados de Michaelis-Menten, aspecto que ya fuera mencionado en un trabajo anterior (Castro *et al.*, 2009). Más aún, el resultado de la lisis se evidencia por la desaparición de un elemento particulado, es decir en un paso discreto, no continuo. Debe mencionarse además, que la relación existente entre el número de moléculas de lisozima, por una parte y el número de bacterias (sustrato medible) en cualquiera de los ensayos turbidimétricos es tal que se encuentran, por lo menos, 10.000 moléculas de enzima por cada célula bacteriana. Este hecho no es congruente con el concepto fundamental de Michaelis-Menten, donde la relación entre mol de enzima y mol de sustrato debe ser extraordinariamente pequeño. En este sentido, la imposibilidad de expresar la medición turbidimétrica de la lisozima en términos molares ya fue señalada por John (1993). Entre algunas de las consecuencias de la naturaleza particulada del sustrato señalamos que un exceso de moléculas de la enzima por cada micrococo, no aumenta en forma linealmente proporcional la velocidad de lisis. De todas formas, la enzima también puede estudiarse mediante el uso de sustratos artificiales (Yang y Hamaguchi, 1980; John, 1993), que permite el análisis clásico de Michaelis-Menten, pero no lo utilizamos en este trabajo.

Otro aspecto destacable de la lisozima de este insecto respecto a la de los mamíferos corresponde a la persistencia de la actividad. Las curvas de actividades en función del tiempo muestran una subsistencia de la capacidad lítica de horas e incluso de días. Tomadas a largo tiempo las curvas de lisis producidas por las distintas diluciones poseen un patrón de variación similar, dado que tienden a ser relativamente paralelas, como se observa en la Figura 1. En los mamíferos en cambio, la actividad lítica disminuye con los minutos hasta formar una meseta con un minúsculo, o más generalmente nulo, incremento. Una razón biológica podría residir en el hecho que la defensa antimicrobiana de estos animales ectotérmicos exige una actividad lítica que sea eficiente a temperatura ambiente y que persista aún después de la muerte del individuo para dis-

minuir los riesgos de propagación del microorganismo atacante.

En suma, una consecuencia práctica de las observaciones llevadas a cabo con el método turbidimétrico consiste en la recomendación de leer la actividad inicial dentro de los primeros 90 segundos y con varias diluciones de la muestra.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo de la Fundación Miguel Lillo y del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (Proyecto CIUNT 26G 415).

Agradecemos al Dr. Fernando Navarro de la Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, sus valiosos consejos; a la Dra. Gabriela Murúa de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán, la colaboración brindada, y a la Dra. Teresa Vera de la Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, por la lectura crítica del borrador.

LITERATURA CITADA

Adamo, S. A. 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. Journal of Insect Physiology, 50: 209-216.

Bae, S. y Kim, Y. 2003. Lysozyme of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: activity induction and cDNA structure. Comparative Biochemical Physiology B: Biochemical Molecular Biology, 135: 511-519.

Benarjee, S. K., Kregar, I., Turk, V. y Rupley, J. A. 1973. Lysozyme catalyzed reaction of the N-acetylglucosamine hexasaccharide. Journal of Biological Chemistry, 248: 4786-4792.

Castro, F., Rodriguez, A., Juárez, G. y Fernández, F. 2009. Aspectos comparativos de la determinación de la actividad lítica de la lisozima. Acta Zoológica Lilloana, 53: 49-56

Chapelle, M., Girard, P. A., Cousserans, F., Volkoff, N. A. y Duvic, B. 2009. Lysozymes and lysozyme-like proteins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Molecular Immunology, 47: 261-269.

Düring, K., Porsh, P., Mahn, A., Brinkmann, O. y Gieffers, W. 1999. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozyme. FEBS Letters, 449: 93-100.

Erban, T. y Hubert, J. 2008. Digestive function of lysozyme in synanthropic acaridid mites enables utilization of bacteria as a food source. Experimental Applied Acarology, 44: 199-212.

Feng, C., Song, Q., Lü, W. y Lu, J. 2008. Purification and characterization of hemolymph prophenoloxidase from *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 151: 139-146.

Fernandez Sousa, J. M., Gavilanes, J. G., Municio, A. M., Pérez Aranda, A. y Rodriguez, R. 1977. Lysozyme from the insect *Ceratitis capitata* eggs. European Journal of Biochemistry, 72: 25-33.

Gandhe, A. S., Janardhan, G. y Nagaraju, J. 2007. Immune up regulation of novel antibacterial proteins from silkmoths (Lepidoptera) that resemble lysozyme but lack muramidase activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37: 655-666.

Ibrahim, H. R., Matsuzaki, T. y Aoki, T. 2001. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. FEBS Letters, 506: 27-32.

John, R. 1993. Photometric assays. En: R. Eisenthal y M. J. Danson (eds), Enzyme Assays: a practical approach. IRL Press, Oxford University Press, 351 pp.

Kajla, M. K., Andreeva, O., Gilbreath III, T. M. y Paskewitz, S. M. 2010. Characterization of expression, activity and role in antibacterial immunity of *Anopheles gambiae* lysozyme c-1. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 155: 201-209.

Kopáček, P., Vogt, R., Jindrák, L., Weise, C. y Šafařík, I. 1999. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29: 989-997.

Markart, P., Faust, N., Graf, T., Weaver, T. E. y Akinbi, H. 2004. Comparison of the microbicidal and muramidase activities of lysozyme M and P. Biochemical Journal, 380: 385-392.

Masaki, K., Aizawa, T., Koganesawa, N., Nimori, T., Bando, H., Kawano, K. y Nitta, K. 2001. Thermal stability and enzymatic activity of a smaller lysozyme from silk moth (*Bombyx mori*). Journal of Protein Chemistry, 20: 107-113.

Matsuura, A., Yao, M., Aizawa, T., Koganesawa, N., Masaki, K., Miyazawa, M., Demura, M., Tanka, I., Kawano, K., y Nitta, K. 2002. Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures. Biochemistry, 41: 12086-12092.

Murúa, M. G., Juárez, M. L., Prieto, S., Gastaminza, G. y Willink, E. 2009. Distribución temporal y espacial de poblaciones larvarias de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) en diferentes hospederos en provincias del norte de la Argentina. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán, 86: 25-36.

Nasr, N. M. y Fallon, A. M. 2003. Detection of lysozyme-like enzymatic activity secreted by an immune-responsive mosquito cell line. Journal of Invertebrate Pathology, 82: 162-166.

Rao, X. J., Ling, E. y Yu, X. Q. 2010. The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: an in vitro approach. Developmental and Comparative Immunology, 34: 264-271.

Regel, R., Matioli, S. R. y Terra, W. R. 1998. Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 28: 309-319.

Rodriguez, A., Castro, F., Juarez, G., Chireno, G. y Fernández , F. 2009. The concept of lysozyme activity referred to its comparative use. Biocell, 33(2): A168.

Shrestha, S. y Kim, Y. 2009. Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 73: 2077-2084.

Sun, S.-C., Asting, B. y Faye, I. 1991. Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. The Journal of Biology Chemistry, 266: 6644-6649.

Svensson, I., Calles, K., Lindskog, E., Henriksson, H., Eriksson, U. y Haggstrom, L. 2005. Antimicrobial activity of conditioned medium fractions from *Spodoptera frugiperda* Sf9 and *Trichoplusia ni* Hi5 insect cells. Applied Microbiology and Biotechnology, 69: 92-98.

Valverde, L., Toledo, Z. D. A. de, y Popich, S. 1995. Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Acta Zoológica Lilloana, 43 (1): 131-143.

Vargas Albores, F. y Ortega Rubio, A. 1994. El sistema inmune humoral de los insectos. Tópicos de Investigación y Posgrado, 4: 21-28.

Vilmos, P. y Kurucz, E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunology Letters, 62: 59-66.

Willink, E., Costilla, M. A. y Osores, V. M. 1990. Principales plagas del maíz: daños, pérdidas y recomendaciones para la siembra. Avance Agroindustrial, 42(11): 17-19.

Yang, Y. y Hamaguchi, K. 1980. Hydrolysis of 4-umbilliferyl N-acetyl-chitotrioside catalyzed by hen and turkey lysozyme. Journal of Biochemistry, 87: 1003-1014.

Yu, K. H., Kim, K. N., Lee, J. H., Lee, H. S., Kim, S. H., Cho, K. Y., Nam, M. H. y Lee, I. H. 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. Developmental and Comparative Immunology, 26: 707-713.